

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

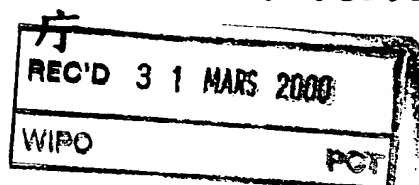
PCT/JP 00/00742
09/890969
10.02.00

JP00/742

日 本 国 特 許

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

EU



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

22278 U.S. PTO
09890969

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 6月25日



出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第180546号

出 願 人
Applicant(s):

明治乳業株式会社

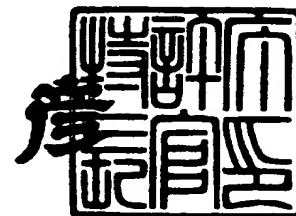
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月17日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3016248

【書類名】 特許願

【整理番号】 P02531106

【提出日】 平成11年 6月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 フランス国 6 7 0 8 4 ストラスブール、リュ・ブレ
イズ パスカル5 ルイ・パスツール大学 フランス国
立科学研究所内

【氏名】 バン リュー

【発明者】

【住所又は居所】 フランス国 6 7 0 8 4 ストラスブール、リュ・ブレ
イズ パスカル5 ルイ・パスツール大学 フランス国
立科学研究所内

【氏名】 ガビー シュミット

【発明者】

【住所又は居所】 フランス国 6 7 0 8 4 ストラスブール、リュ・ブレ
イズ パスカル5 ルイ・パスツール大学 フランス国
立科学研究所内

【氏名】 フローレンス キーリング

【発明者】

【住所又は居所】 フランス国 6 7 0 8 4 ストラスブール、リュ・ブレ
イズ パスカル5 ルイ・パスツール大学 フランス国
立科学研究所内

【氏名】 セリーヌ ジルランダージャンゲス

【発明者】

【住所又は居所】 フランス国 6 7 0 8 4 ストラスブール、リュ・ブレ
イズ パスカル5 ルイ・パスツール大学 フランス国
立科学研究所内

【氏名】 フィリップ シャベルト

【発明者】

【住所又は居所】 フランス国 6 7 0 8 4 ストラスブール、リュ・レネ
デュスカルツユ 2 1 ルイ・パスツール大学 フラ
ンス国立科学研究所内

【氏名】 ジュアン・フィリップ レフラー

【発明者】

【住所又は居所】 フランス国 6 7 0 8 4 ストラスブール、リュ・レネ
デュスカルツユ 2 1 ルイ・パスツール大学 フラ
ンス国立科学研究所内

【氏名】 ベルナデット ルッツ・ブッシュェル

【発明者】

【住所又は居所】 フランス国 6 7 0 8 4 ストラスブール、リュ・レネ
デュスカルツユ 2 1 ルイ・パスツール大学 フラ
ンス国立科学研究所内

【氏名】 ジョセールイ ゴンザレス

【発明者】

【住所又は居所】 東京都墨田区緑 1 丁目 2 6 番 1 1 号 明治乳業株式会社
栄養・医薬開発部内

【氏名】 山田 昌司

【発明者】

【住所又は居所】 東京都墨田区緑 1 丁目 2 6 番 1 1 号 明治乳業株式会社
栄養・医薬開発部内

【氏名】 須磨 幸恵

【特許出願人】

【識別番号】 000006138

【氏名又は名称】 明治乳業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100068700

【弁理士】

【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562

【弁理士】

【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096736

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】

【識別番号】 100106909

【弁理士】

【氏名又は名称】 棚井 澄雄

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第 33312号

【出願日】 平成11年 2月10日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011752

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9715831

【プルーフの要否】 要

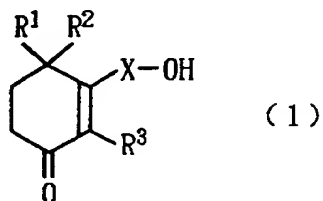
【書類名】 明細書

【発明の名称】 神経変性疾患の予防又は治療薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記一般式 (1)

【化 1】



〔式中、R¹、R² 及び R³ はそれぞれ水素原子又はメチル基を示し、X は炭素数 10～28 の直鎖状又は分岐状のアルキレン又はアルケニレン基を示す〕

で表されるシクロヘキセノン長鎖アルコール化合物を有効成分とする神経変性疾患の予防又は治療薬。

【請求項 2】 神経変性疾患が、筋萎縮性側索硬化症である請求項 1 記載の予防又は治療薬。

【請求項 3】 神経変性疾患が、スーパオキシドジスムターゼ遺伝子変異による障害である請求項 1 記載の予防又は治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、神経変性疾患の予防又は治療薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

神経変性疾患の代表的なものには、大脳皮質を主座とするアルツハイマー病やピック病 (Pick) など、大脳基底核を主座とするパーキンソン病やハンチントン病など、小脳を主座とする脊髄小脳変性症、脊髄を主座とする筋萎縮性側索硬化症などがある。神経変性疾患の定義は教科書でも正面きって取り上げているものは少ない。あえて定義するとすれば、ある系統 (例えば、錐体路系、後索系、脊

髄小脳系など)の障害が単独で、あるいはそれらが組み合わさった臨床症状として、じわじわと緩徐に発現し進行する疾患であり、かつその真の原因が不明なものを神経変性疾患と総称する[金澤一郎:最新内科学大系, 68: p.3, 中山書店(1997)]。

【0003】

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、皮質、脳幹、及び脊髄の運動ニューロン (motor neuron) の選択的障害によって特徴づけられる致死的な神経性疾患で、進行性の筋萎縮と深部腱反射の亢進などを主症状とする。最近、家族性ALS (familial amyotrophic lateral sclerosis: FALS) や孤発性ALS (SALS) の一部について、その原因遺伝子として、フリーラジカスカベンジャーであるCu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase: SOD) 遺伝子の点突然変異が相次いで報告され注目を集めている (Deng, H. et al.: Science, 261: 1047-1051, 1993; Rosen, DR. et al.: Nature, 363: 59-62, 1993; Jones, CT. et al.: Lancet, 342: 1050-1061, 1993)。

【0004】

ALS の治療に、神経保護剤 (抗酸化剤及び抗興奮剤) や神経再生剤 (neuroregenerative) 神経栄養因子 (neurotrophic factor) が試みられているが、非常に弱い効果しか認められていない。すなわち、毛様体由来神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor: CNTF)、インスリン様増殖因子 (insulin growth factor-1: IGF-1)、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) 及び神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) の、ALS に対する作用が数多く報告されているが、その効果は弱く、満足できるものではなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ALS を含む神経変性疾患の予防又は治療薬を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、すでに、シクロヘキセノン骨格を有する長鎖アルコールが、優

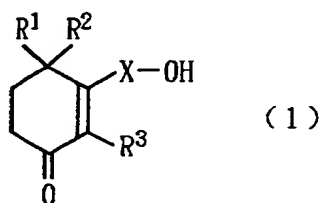
れた神経突起伸展能を有し、神経成長因子として有用性であることを見出し特許出願している (PCT/JP98/03560)。その後、本発明者らは、Cu/Zn SOD-1 遺伝子のミスセンス変異を有するトランスジェニックマウスに該化合物を投与すると、対照群に比較して、生存期間が有意に延長されることから、該化合物が、SOD-1 変異遺伝子の過剰発現による運動ニューロンの変性に起因する神経変性疾患、とりわけ、ALS の予防・治療薬として有用であることを見出し、本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明は、下記一般式 (1)

【0008】

【化 2】



【0009】

〔式中、R¹、R² 及び R³ はそれぞれ水素原子又はメチル基を示し、X は炭素数 10～28 の直鎖状又は分岐状のアルキレン又はアルケニレン基を示す〕

で表されるシクロヘキセノン長鎖アルコール化合物を有効成分とする神経変性疾患の予防又は治療薬を提供するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】

上記一般式 (1) 中、X は炭素数 10～28 の直鎖状又は分岐状のアルキレン又はアルケニレン基であるが、分岐状のアルキレン又はアルケニレン基の場合の側鎖としては炭素数 1～10 のアルキル基が挙げられる。当該側鎖アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、tert-ペンチル基、ヘキシル基、イソヘキシル基、ヘプチル

基、オクチル基、ノニル基、デシル基、などが挙げられ、このうち特にメチル基が好ましい。また直鎖状のアルキレン基又はアルケニレン基（少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有するアルケン構造を意味する）への側鎖の置換は、3及び/又は7位が好ましい。これらのXのうち、炭素数10～28の直鎖状アルキレン基がより好ましく、炭素数10～18の直鎖状アルキレン基が特に好ましい。また、 R^1 、 R^2 及び R^3 はそれぞれ水素原子又はメチル基を示すが、少なくとも1個がメチル基である場合がより好ましい。

【0011】

また、一般式(1)の化合物は、薬学的に許容される塩、又はその溶媒もしくは水和物の形態であってもよい。またこの化合物(1)には、各種の異性体が存在し得るが、これらの異性体も本発明に含まれる。

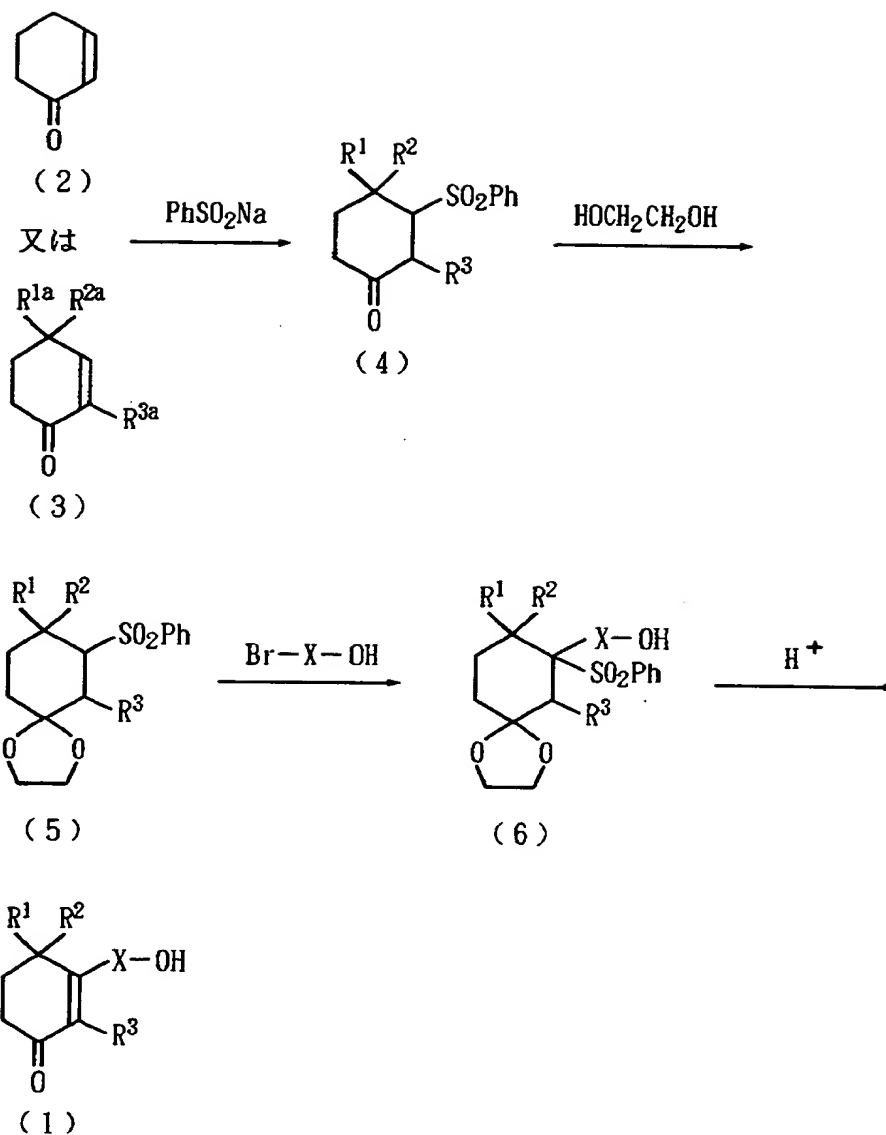
【0012】

この化合物(1)は、例えば次の製法A又は製法Bに従って製造することができる。

【0013】

【化 3】

〔製法 A〕



【0014】

〔式中、 R^{1a} 、 R^{2a} 及び R^{3a} は水素原子又はメチル基を示すが、少なくとも1個はメチル基を示し、Phはフェニル基を示し、X、 R^1 、 R^2 及び R^3 は前記と同じ〕

【0015】

すなわち、シクロヘキセノン (2) 又はメチル置換 2-シクロヘキセン-1-

オン(3)にベンゼンスルフィン酸塩を酸の存在下に反応させて化合物(4)とし、これにエチレングリコールを反応させてケタール体(5)を得、次いで ω -ハロゲノアルカノール又は ω -ハロゲノアルケノールを反応させて化合物(6)とし、これを酸処理して保護基を脱離せしめることにより化合物(1)が得られる。

【0016】

ここで原料として用いられるメチル置換2-シクロヘキセン-1-オン(3)は、メチル置換シクロヘキサノンにブチルリチウムの存在下トリアルキルシリルハライドを反応させた後、パラジウム系触媒の存在下に酸化することにより得られる。

【0017】

まず、シクロヘキセノン(2)又はメチル置換2-シクロヘキセン-1-オン(3)とベンゼンスルフィン酸塩、例えばベンゼンスルフィン酸ナトリウムとの反応は、塩酸、硫酸、リン酸等の酸の存在下、0~100℃の温度で5~40時間行うのが好ましい。

【0018】

化合物(4)とエチレングリコールとの反応は、無水パラトルエンスルホン酸などの縮合剤の存在下50~120℃の温度で1~10時間行うのが好ましい。

【0019】

ケタール体(5)に反応させる ω -ハロゲノアルカノールとしては、 ω -ブromoアルカノールが好ましい。ケタール体(5)と ω -ハロゲノアルカノールとの反応は、ブチルリチウム等の金属化合物の存在下、低温条件で行うのが好ましい。

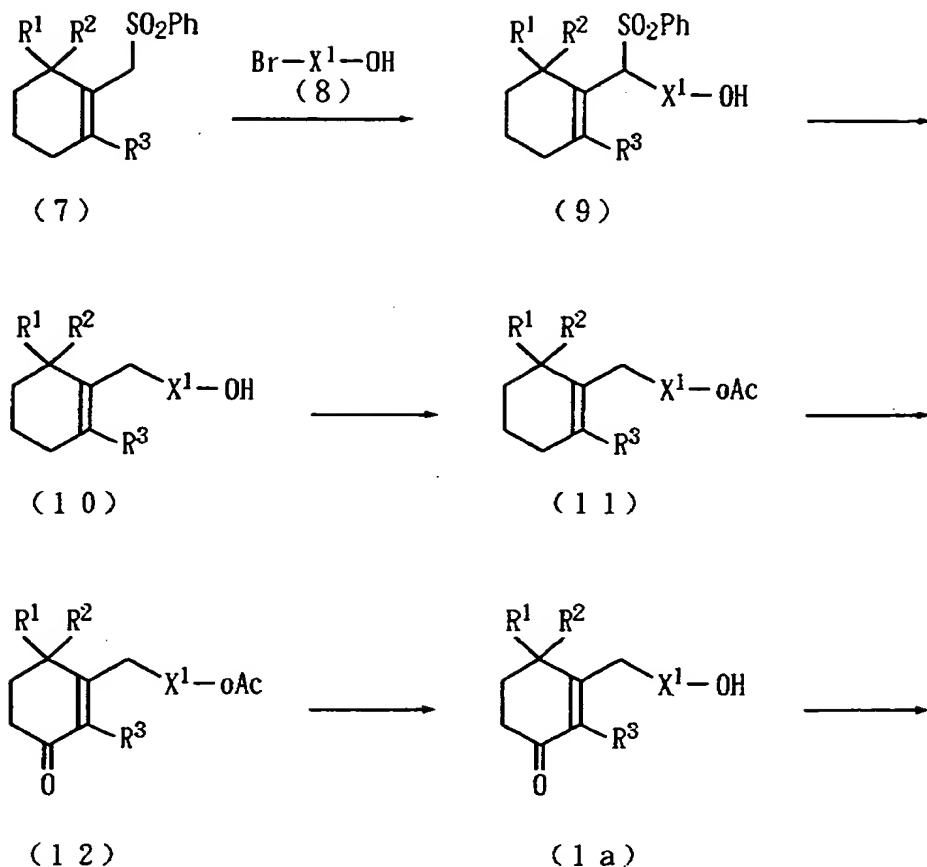
【0020】

得られた化合物(6)からフェニルスルホニル基及びケタール保護基を脱離せしめるには、例えばパラトルエンスルホン酸等の酸を反応させることにより行うのが好ましい。

【0021】

【化 4】

〔製法 B〕



【0022】

〔式中、 X^1 は炭素数 9～27 のアルキレン又はアルケニレン基を示し、Ac はアシル基を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び Ph は前記と同じ〕

すなわち、化合物 (7) 〔例えば、Synthesis, 1996, Nov. に準じて得られる〕に ω -ブromoアルコールを反応させて化合物 (9) とし、次いでフェニルスルホニル基を脱離せしめて化合物 (10) を得、このヒドロキシ基を保護して化合物 (11) とした後、酸化して化合物 (12) とし、次いでヒドロキシ保護基を脱離せしめることにより化合物 (1a) が得られる。

化合物 (7) と化合物 (8) との反応は、ブチルリチウム等の金属化合物の存在下、低温条件で行うのが好ましい。

化合物（９）からフェニルスルホニル基を脱離せしめるには、例えばナトリウムアマルガムの存在下リン酸塩等を反応させることにより行われる。

化合物（１０）のヒドロキシ保護基としては、アセチル基等が好ましく、保護反応は例えば化合物（１０）に無水酢酸を反応させることにより行われる。

化合物（１１）の酸化反応は三塩化ルテニウム等の金属化合物の存在下、ｔ-ブチルヒドロパーオキサイド等のアルキルヒドロパーオキサイドを反応させることにより行われる。

化合物（１２）の保護基の脱離反応は、炭酸カリウム等の塩基の存在下に加水分解するのが好ましい。

【 0 0 2 3 】

上記したように、FALS やSALSの一部に、Cu/Zn SOD（SOD-1）の変異が見出されていることから、マウスSOD-1 遺伝子に、FALSの遺伝子に見出される変異の一つに対応するミスセンス変異を導入したトランスジェニックマウスを用いて、化合物（１）投与による、該トランスジェニックマウスの生存期間延長効果を調べた。化合物（１）を該トランスジェニックマウスに投与した群の生存期間は、対照群のそれに対して、有意に延長した。

【 0 0 2 4 】

該トランスジェニックマウスは、マウスSOD-1 遺伝子の第四エクソン中のGly-86をArg に変異（G86R）させたマウス（Ripps M. E. et al.: Proc.Natl.Acad.Sci.USA.92:689-693,1995）である。該トランスジェニックマウスの中樞神経系での該変異遺伝子の過剰発現は、脊髄、脳幹、及び新皮質の運動ニューロンの退行性の変性に伴う、年齢関連の急速な進行性の運動機能の低下と関連している（Ripps M. E. et al.: Proc.Natl.Acad.Sci.USA.92:689-693,1995）。一部のFALS患者は、該トランスジェニックマウスと同様の遺伝子変異が原因とされているため、ALS 疾患のモデルの一つである。

【 0 0 2 5 】

本発明で用いたトランスジェニックマウスは、Cu/Zn SOD-1 をコードする遺伝子にミスセンス変異（G86R）を導入したマウスで、このALS にリンクした変異体の過剰発現によって、ALS 患者に観察されるのに類似する運動ニューロンの変性

が進行し、麻痺のため、生存後 90 ± 5 日で死亡する。

【0026】

化合物（1）が、該トランスジェニックマウスの生存期間を大幅に延長させる機序は、現在のところ不明であるが、本発明の実験結果は、化合物（1）が、SOD 変異遺伝子の発現による障害の予防又は治療に有用であることを示している。

【0027】

また、化合物（1）は、胎児ラット大脳半球由来ニューロンに対し、優れた神経突起伸展効果を示し、とりわけ、化合物番号 9、10、20、23、及び 24 は、bFGF に比較して、極めて優れた神経突起伸展効果を示す（表 1 参照）。

【0028】

すなわち、化合物（1）は、SOD 遺伝子変異による障害を抑制する作用を有し、また、神経細胞に直接作用して、神経突起伸展促進などの神経栄養因子効果を示すので、SOD 遺伝子変異による障害、ALS などの神経変性疾患の予防又は治療に有用である。

【0029】

化合物（1）は、経口投与又は非経口投与（筋肉内、皮下、静脈内、坐薬など）のいずれでも投与できる。

【0030】

経口用製剤を調製する場合、賦形剤、さらに必要に応じて、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤などを加えた後、常法により、錠剤、被服錠剤、顆粒剤、カプセル剤、溶液剤、シロップ剤、エリキシル剤、油性又は水性の懸濁液剤などとする。賦形剤としては、例えば、乳糖、コーンスターチ、白糖、ブドウ糖、ソルビット、結晶セルロースなどが挙げられる。結合剤としては、例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、エチルセルロース、メチルセルロース、アラビアゴム、トラガント、ゼラチン、シェラック、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

【0031】

崩壊剤としては、例えば、デンプン、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、炭

酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、クエン酸カルシウム、デキストラン、ペクチンなどが挙げられる。滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、シリカ、硬化植物油などが挙げられる。着色剤としては、医薬品に添加することが許可されているものが使用できる。矯味矯臭剤としては、ココア末、ハッカ脳、芳香酸、ハッカ油、竜脳、桂皮末などが使用できる。これらの錠剤は、顆粒剤には、糖衣、ゼラチン衣、その他必要により適宜コーティングしてもよい。

【0032】

注射剤を調製する場合、必要により、pH調整剤、緩衝剤、安定化剤、保存剤などを添加し、常法により、皮下、筋肉内、静脈内注射剤とする。注射剤は、溶液を容器に収納後、凍結乾燥などによって、固形製剤として、用事調製の製剤としてもよい。また、一投与量を容器に収納してもよく、また、多投与量を同一の容器に収納してもよい。

【0033】

本発明の化合物の医薬としての投与量は、ヒトの場合、成人1日当たり通常0.01～1000mg、好ましくは、0.1～100mgの範囲で、1日量を1日1回、あるいは2～4回に分けて投与する。

【0034】

【実施例】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0035】

製造例1

(1) ベンゼンスルフィニック酸ナトリウム10.25gをシクロヘキサノン5mlと水30mlの溶液に加える。この溶液に1N塩酸60mlを滴下する。室温で24時間攪拌後、析出晶をろ過し、水、イソプロパノール、冷エーテルで洗浄する。イソプロパノールで再結晶し、白色結晶の3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサノン-1-オンを5.74g(融点83～85℃)を得る。(収率97%)

【0036】

(2) 3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサン-1-オン 5.3 g をベンゼン 60 ml に溶解した液に 1,2-エタンジオール 0.3 ml と無水パラトルエンスルホン酸 0.2 g を加える。反応液を 4 時間加熱還流させる。反応後、2M 炭酸水素ナトリウム水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出する。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去後、エーテルで再結晶し、白色結晶の 1,1-(エチレンジオキシ)-3-(フェニルスルフォニル)-シクロヘキサン 6.1 g (融点 93~95℃) を得る。(収率 97%)

【0037】

(3) 1,1-(エチレンジオキシ)-3-(フェニルスルフォニル)-シクロヘキサン 565 mg とトリフェニルメタン 4 mg の 5 ml THF 溶液にアルゴン気流下、-78℃ で n-ブチルリチウム 2 ml の溶液を滴下する。10 分攪拌後、室温で 1 時間反応する。HMPT 1 ml を加え、再び -78℃ に冷却し、10-ブromo-1-デカノール 159 mg の 2 ml THF 溶液を滴下する。

-20℃ で 2 時間反応後、飽和の塩化アンモニウム液に反応液を注ぐ。エーテルで溶液を抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去後、ヘキサン-酢酸エチルでのシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、無色オイルの 1,1-(エチレンジオキシ)-3-(10-ヒドロキシデシル)-3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサン 265 mg を得る。(収率: 90%)

【0038】

(4) 1,1-(エチレンジオキシ)-3-(10-ヒドロキシデシル)-3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサン 193 mg のクロロホルム 3 ml 及びアセトン 0.6 ml の溶液にパラトルエンスルホン酸 20 mg を加える。混合液を 24 時間 50℃ で反応する。飽和炭酸水素ナトリウム水 10 ml を加え、ジクロルメタンで抽出する。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去後、ヘキサン-酢酸エチルでのシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、無色オイルの 3-(10-ヒドロキシデシル)-2-シクロヘキセン-1-オン 86 mg を得る。(収率: 77%)

【0039】

製造例1と同様にして次の化合物を得た。

製造例2：3-(11-ヒドロキシウンデシル)-2-シクロヘキセン-1-オン (融点34~35℃)。

【0040】

製造例3：3-(12-ヒドロキシドデシル)-2-シクロヘキセン-1-オン (融点35~36℃)。

【0041】

製造例4：3-(13-ヒドロキシトリデシル)-2-シクロヘキセン-1-オン (融点42~43℃)。

【0042】

製造例5：3-(14-ヒドロキシテトラデシル)-2-シクロヘキセン-1-オン (融点44~45℃)。

【0043】

製造例6

(1) N, N-ジイソプロピルアミン7mlの20ml THF溶液に-78℃にて、1.4Mのn-ブチルリチウム液35.4mlを滴下する。溶液を0℃で30分攪拌する。4-メチルシクロヘキサン-1-オン4mlの10ml THF液に-78℃にて、先のLDA溶液を滴下する。-78℃で1時間攪拌後、トリメチルシリルクロライド6.5mlを滴下する。室温で1時間攪拌後、溶液を炭酸水素ナトリウム水に注ぎ、エーテルで抽出する。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去後、減圧蒸留し、4-メチル-1-(トリメチルシリルオキシ)-1-シクロヘキセン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:8-2) Rf=0.8) を5.83gを得る。(収率: 96%)

【0044】

(2) 4-メチル-1-(トリメチルシリルオキシ)-1-シクロヘキセン3.53gの70ml DMSO溶液に酢酸パラジウムを触媒量加え、6時間酸素を導入し攪拌する。0℃で水を加え、ろ過後、エーテルで抽出する。有機層を減圧下溶媒を留去し、残渣をヘキサン-水に溶解しヘキサンで抽出する。ヘキサン層を飽

和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去し、4-メチル-2-シクロヘキセン-1-オン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:8-2) R_f =0.35) のオイルを得る。(収率72%)

【0045】

(3) ベンゼンスルフィニック酸ナトリウム3.0gを4-メチル-2-シクロヘキセン-1-オン1.52gと水9mlの溶液に加える。この溶液に1N塩酸18mlを滴下する。室温で24時間攪拌後、析出晶をろ過し、水、イソプロパノール、冷エーテルで洗浄する。イソプロパノールで再結晶し、白色結晶の4-メチル-3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサン-1-オン(融点71~74℃)を得る。(収率72%)

【0046】

(4) 4-メチル-3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサン-1-オン2.45gをベンゼン40mlに溶解した液に1,2-エタンジオール0.7mlと無水パラトルエンスルホン酸0.2gを加える。反応液を4時間加熱還流させる。反応後、2M炭酸水素ナトリウム水を加え、酢酸エチルで3回抽出する。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去後、エーテルで再結晶し、白色結晶の1,1-(エチレンジオキシ)-4-メチル-3-(フェニルスルフォニル)-シクロヘキサン(融点105~106℃)を得る。(収率97%)

【0047】

(5) 1,1-(エチレンジオキシ)-4-メチル-3-(フェニルスルフォニル)-シクロヘキサン560mgとトリフェニルメタン4mgの5ml THF溶液にアルゴン気流下、-78℃でn-ブチルリチウム1.8mlの溶液を滴下する。10分攪拌後、室温で1時間反応する。HMPT 1mlを加え、再び-78℃に冷却し、10-ブロモ-1-デカノール166mgの2ml THF溶液を滴下する。-20℃で2時間反応後、飽和の塩化アンモニウム液に反応液を注ぐ。エーテルで溶液を抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去後、ヘキサン-酢酸エチルでのシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、無色オイルの1,1-(エチレンジオキシ)-3-(10-ヒドロ

キシデシル) - 4 - メチル - 3 - (フェニルスルホニル) - シクロヘキサン (TLC : (ヘキサン-AcOEt:6-4)Rf=0.14) を得る。(収率: 97%)

【0048】

(6) 1, 1 - (エチレンジオキシ) - 3 - (10-ヒドロキシデシル) - 4 - メチル - 3 - (フェニルスルホニル) - シクロヘキサン 235 mg のクロロホルム 20 ml 及びアセトン 4 ml の溶液にパラトルエンスルホン酸 20 mg を加える。混合液を 24 時間 50℃ で反応する。飽和炭酸水素ナトリウム水 10 ml を加え、ジクロルメタンで抽出する。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去後、ヘキサン-酢酸エチルでのシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、無色オイルの 3 - (10-ヒドロキシデシル) - 4 - メチル - 2 - シクロヘキセン - 1 - オン (CCM : (ヘキサン-AcOEt:6-4)Rf=0.2) を得る。(収率: 75%)

【0049】

製造例 6 と同様にして次の化合物を得た。

製造例 7 : 3 - (11-ヒドロキシウンデシル) - 4 - メチル - 2 - シクロヘキセン - 1 - オン (TLC : (ヘキサン-AcOEt:6-4)Rf=0.21)。

【0050】

製造例 8 : 3 - (12-ヒドロキシドデシル) - 4 - メチル - 2 - シクロヘキセン - 1 - オン (TLC : (ヘキサン-AcOEt:6-4)Rf=0.22)。

【0051】

製造例 9 : 3 - (13-ヒドロキシトリデシル) - 4 - メチル - 2 - シクロヘキセン - 1 - オン (TLC : (ヘキサン-AcOEt:6-4)Rf=0.25)。

【0052】

製造例 10 : 3 - (14-ヒドロキシテトラデシル) - 4 - メチル - 2 - シクロヘキセン - 1 - オン (TLC : (ヘキサン-AcOEt:6-4)Rf=0.3)。

【0053】

製造例 11

(1) ベンゼンスルフィニック酸ナトリウム 5.98 g を 4, 4 - ジメチル - 2 - シクロヘキセン - 1 - オン 3 ml と水 30 ml の溶液に加える。この溶液に 1 N

塩酸 40 ml を滴下する。室温で 24 時間攪拌後、析出晶をろ過し、水、イソプロパノール、冷エーテルで洗浄する。イソプロパノールで再結晶し、白色結晶の 4, 4-ジメチル-3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサノール-1-オン (融点 84~86℃) を得る。(収率 89%)

【0054】

(2) 4, 4-ジメチル-3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサノール-1-オン 4.4 g をベンゼン 45 ml に溶解した液に 1, 2-エタンジオール 1.1 ml と無水パラトルエンスルホン酸 0.3 g を加える。反応液を 4 時間加熱還流させる。反応後、2 M 炭酸水素ナトリウム水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出する。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去後、エーテルで再結晶し、白色結晶の 4, 4-ジメチル-1, 1-(エチレンジオキシ)-3-(フェニルスルフォニル)-シクロヘキサン (融点 113~115℃) を得る。(収率 84%)

【0055】

(3) 4, 4-ジメチル-1, 1-(エチレンジオキシ)-3-(フェニルスルフォニル)-シクロヘキサン 930 mg とトリフェニルメタン 4 mg の 5 ml THF 溶液にアルゴン気流下、-78℃ で *n*-ブチルリチウム 2.93 ml の溶液を滴下する。10 分攪拌後、室温で 1 時間反応する。HMPT 1 ml を加え、再び -78℃ に冷却し、10-ブロモ-1-デカノール 236 mg の 2 ml THF 溶液を滴下する。

-20℃ で 2 時間反応後、飽和の塩化アンモニウム液に反応液を注ぐ。エーテルで溶液を抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去後、ヘキサン-酢酸エチルでのシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、無色オイルの 4, 4-ジメチル-1, 1-(エチレンジオキシ)-3-(10-ヒドロキシデシル)-3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:6-4) R_f=0.15) を得る。(収率: 94%)

【0056】

(4) 4, 4-ジメチル-1, 1-(エチレンジオキシ)-3-(10-ヒドロキシデシル)-3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサン 400 mg のクロロ

ホルム 30 ml 及びアセトン 6 ml の溶液にパラトルエンスルホン酸 20 mg を加える。混合液を 24 時間 50℃ で反応する。飽和炭酸水素ナトリウム水 10 ml を加え、ジクロルメタンで抽出する。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去後、ヘキサン-酢酸エチルでのシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、無色オイルの 4, 4-ジメチル-3-(10-ヒドロキシデシル)-2-シクロヘキセン-1-オン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:6-4) $R_f=0.25$) を得る。(収率: 78%)

【0057】

製造例 11 と同様にして次の化合物を得た。

製造例 12: 3-(11-ヒドロキシウンデシル)-4, 4-ジメチル-2-シクロヘキセン-1-オン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:6-4) $R_f=0.25$)。

【0058】

製造例 13: 3-(12-ヒドロキシドデシル)-4, 4-ジメチル-2-シクロヘキセン-1-オン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:6-4) $R_f=0.27$)。

【0059】

製造例 14: 3-(13-ヒドロキシトリデシル)-4, 4-ジメチル-2-シクロヘキセン-1-オン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:6-4) $R_f=0.3$)。

【0060】

製造例 15: 3-(14-ヒドロキシテトラデシル)-4, 4-ジメチル-2-シクロヘキセン-1-オン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:6-4) $R_f=0.3$)。

【0061】

製造例 16

(1) ベンゼンスルフィニック酸ナトリウム 2.9 g を 2-メチル-2-シクロヘキセン-1-オン 1.5 g と水 8 ml の溶液に加える。この溶液に 1 N 塩酸 16 ml を滴下する。室温で 24 時間攪拌後、析出晶をろ過し、水、イソプロパノール、冷エーテルで洗浄する。イソプロパノールで再結晶し、白色結晶の 2-メチル-3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサン-1-オン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:6-4) $R_f=0.25$) を得る。(収率 93%)

【0062】

(2) 2-メチル-3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサン-1-オン 1.4 g をベンゼン 20 ml に溶解した液に 1, 2-エタンジオール 0.41 ml と無水パラトルエンスルホン酸 0.1 g を加える。反応液を 4 時間加熱還流させる。反応後、2M 炭酸水素ナトリウム水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出する。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去後、エーテルで再結晶し、白色結晶の 1, 1-(エチレンジオキシ)-2-メチル-3-(フェニルスルフォニル)-シクロヘキサン (融点 76~77℃) を得る。(収率 95%)

【0063】

(3) 1, 1-(エチレンジオキシ)-2-メチル-3-(フェニルスルフォニル)-シクロヘキサン 304 mg とトリフェニルメタン 4 mg の 5 ml THF 溶液にアルゴン気流下、-78℃でn-ブチルリチウム 1.02 ml の溶液を滴下する。10分攪拌後、室温で1時間反応する。HMPT 1 ml を加え、再び-78℃に冷却し、10-ブロモ-1-デカノール 90 mg の 2 ml THF 溶液を滴下する。-20℃で2時間反応後、飽和の塩化アンモニウム液に反応液を注ぐ。エーテルで溶液を抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去後、ヘキサン-酢酸エチルでのシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、無色オイルの 1, 1-(エチレンジオキシ)-3-(10-ヒドロキシデシル)-2-メチル-3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:6-4) R_f=0.2) を得る。(収率: 92%)

【0064】

(4) 1, 1-(エチレンジオキシ)-3-(10-ヒドロキシデシル)-2-メチル-3-(フェニルスルホニル)-シクロヘキサン 388 mg のクロロホルム 30 ml 及びアセトン 6 ml の溶液にパラトルエンスルホン酸 20 mg を加える。混合液を 24 時間 50℃で反応する。飽和炭酸水素ナトリウム水 10 ml を加え、ジクロルメタンで抽出する。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥する。減圧下溶媒を留去後、ヘキサン-酢酸エチルでのシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、無色オイルの 3-(10-ヒドロキシデシル)-2-メチル-2-シクロヘキセン-1-オン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:6-4) R_f=0.2) を得

る。(収率:45%)

【0065】

製造例16と同様にして次の化合物を得た。

製造例17:3-(11-ヒドロキシウンデシル)-2-メチル-2-シクロヘキセン-1-オン (TLC:(ヘキサン-AcOEt:6-4) R_f =0.24)。

【0066】

製造例18:3-(12-ヒドロキシドデシル)-2-メチル-2-シクロヘキセン-1-オン (TLC:(ヘキサン-AcOEt:6-4) R_f =0.26)。

【0067】

製造例19:3-(13-ヒドロキシトリデシル)-2-メチル-2-シクロヘキセン-1-オン (TLC:(ヘキサン-AcOEt:6-4) R_f =0.28)。

【0068】

製造例20:3-(14-ヒドロキシテトラデシル)-2-メチル-2-シクロヘキセン-1-オン (TLC:(ヘキサン-AcOEt:6-4) R_f =0.3)。

【0069】

製造例21

(1) 1-フェニルスルホニル-2,6,6-トリメチル-1-シクロヘキセン 1g及びトリフェニルメタン4mgを含む乾燥テトラヒドロフラン(8ml)の溶液にアルゴンガス雰囲気下-78℃でn-ブチルリチウムのヘキサン溶液(1.4M)4mlを加えた。10分間攪拌後、室温で攪拌しヘキサメチルリン酸トリアミド1.5mlを加えた。この温度で1時間30分後混合物を-78℃に冷却し、11-ブロモウンデカノール439mgをゆっくり加えた。混合物を-20℃で3時間攪拌し、飽和アンモニウムクロリド溶液40mlに加えた。得られた溶液をエーテルで抽出し、有機層を食塩水で洗浄後硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下に溶媒留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、白色固体として1-(12-ヒドロキシドデシル-1-フェニルスルホニル)-2,6,6-トリメチル-1-シクロヘキセン (TLC:(ヘキサン-AcOEt:6-4) R_f =0.43)を622mg得た。

【0070】

(2) 1-(12-ヒドロキシドデシル)-2, 6, 6-トリメチル-1-シクロヘキセン 579 mgを含む乾燥エタノール溶液 25 ml に、アルゴンガス雰囲気下 0℃で Na_2HPO_4 366 mg 及び水銀ナトリウムアマルガム 4 g を加えた。混合物を室温で 1 時間攪拌した後 5% HCl で冷却し、エーテルで抽出し、水で洗浄した。次に硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下に溶媒を留去し、無色オイルとして 1-(12-アセトキシドデシル)-2, 6, 6-トリメチル-1-シクロヘキセン 353 mg (TLC: (ヘキサン-AcOEt:5-5) $R_f=0.75$) を得た。

【0071】

(3) 1-(12-アセトキシドデシル)-2, 6, 6-トリメチル-1-シクロヘキセン 321 mgを含むシクロヘキサン溶液 6 ml に、水 0.8 ml、ルテニウムトリクロリドヒドラート 1.3 mg 及び 70% tBuOOH 1.26 ml を加えた。溶液を室温で 6 時間攪拌し、セライトで濾過し、濾液を 10% Na_2SO_3 溶液に加えた。溶液をエーテル抽出し、食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後減圧下に溶媒留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、無色オイルとして 3-(12-アセトキシドデシル)-2, 4, 4-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン 227 mg (TLC: (ヘキサン-AcOEt:3-7) $R_f=0.68$) を得た。

【0072】

(4) 3-(12-アセトキシドデシル)-2, 4, 4-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン 132 mgを含む乾燥メタノール溶液 (8 ml) に水 3 滴及び K_2CO_3 74 mg を加えた。室温で 2 時間 30 分攪拌した後、5% HCl で pH を 7 に調整し、エーテル抽出し硫酸マグネシウムで乾燥して減圧下に溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、無色オイルとして 3-(12-ヒドロキシドデシル)-2, 4, 4-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン 94 mg (TLC: (ヘキサン-AcOEt:7-3) $R_f=0.2$) を得た。

【0073】

製造例 21 と同様にして次の化合物を得た。

製造例 22: 3-(13-ヒドロキシドデシル)-2, 4, 4-トリメチル-2

－シクロヘキセン－1－オン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:7-3)Rf=0.2)。

【0074】

製造例 23: 3－(14－ヒドロキシテトラデシル)－2, 4, 4－トリメチル－2－シクロヘキセン－1－オン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:7-3)Rf=0.25)。

【0075】

製造例 24: 3－(15－ヒドロキシペンタデシル)－2, 4, 4－トリメチル－2－シクロヘキセン－1－オン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:7-3)Rf=0.29)。

【0076】

製造例 25: 3－(16－ヒドロキシヘキサデシル)－2, 4, 4－トリメチル－2－シクロヘキセン－1－オン (TLC: (ヘキサン-AcOEt:7-3)Rf=0.26)。

【0077】

試験例 1 変異SOD-1 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの生存試験

10匹のトランスジェニックマウスで実施した。該トランスジェニックマウスは、マウスSOD-1 遺伝子の第四エクソン中のGly-86をArg に変異 (G86R) させたマウス (Ripps M. E. et al.: Proc.Natl.Acad.Sci.USA.92:689-693,1995) である。5匹は、生理食塩水、5匹は、エタノール/Tween 80/生理食塩水 (8/10/82) に溶解した製造例 10 の化合物 [3－(14－ヒドロキシテトラデシル)－4－メチル－2－シクロヘキセン－1－オン] 2mg/kg を40日間連続腹腔内投与 (i.p.) した。1匹は、injection complicationのため90日前に死んだ。残りの4匹は、150日後に死んだ。対照のマウスは全て90日頃に死んだ。生存期間の延長は、150%以上であった。この値は有意性が高かった。

【0078】

試験の間、製造例 10 の化合物を投与したマウスは、全例非常に活動的であったが、対照群では、非常に病的で、60日後には、適切に動くことができなかった。

【0079】

試験例 2

(1) 製造例 10 の化合物 8mg/kg を1週間に3回、死亡するまで腹腔内投与する以外は試験例 1 と同様にして、変異SOD-1 遺伝子を発現するトランスジェニッ

クマウスの生存試験を行った。その結果、対照のマウスが110日頃に全例死亡したが、製造例10の化合物を投与したマウスは平均で150日頃に死亡し、2例は200日以上生存しており、生存期間の延長は130%以上であった。

【0080】

(2) また、(1) のトランスジュニックマウスの生存試験中に、運動機能を確認するためにバー・テストを実施した。すなわち、製造例10の化合物を投与したマウス及び対照のマウスが、直径10mm×長さ45cmの金属棒を何秒で渡れるかを生後80日から91日まで測定した。その結果、図1に示すように製造例10の化合物を投与したマウス、対照のマウス共に、試験開始日に比較し試験最終日まで次第に金属棒を渡る速度が早くなっている。しかし、製造例10の化合物を投与したマウス及び対照のマウスの試験開始日と試験最終日では差の割合が約40%と、製造例10の化合物を投与したマウスが、活動的であった。

【0081】

(3) さらに(1) のトランスジュニックマウスの生存試験において、発症日、すなわちマウスが動けなくなった日を製造例10の化合物を投与したマウス及び対照のマウスで比較した。その結果、製造例10の化合物を投与したマウスは、対照のマウスと比較し、161～180日まで発症日が延長した。発症日は、120%期間が延長した。

【0082】

試験例3 神経突起伸展効果

胎児ラット大脳半球ニューロン(13～15日)を用いた。該ニューロン細胞の培養は、Borgらの方法(Borg, J., et al.: Dev. Brain Res., 18: 37, 1985)に準じて実施した。バラバラにした細胞 1.5×10^5 を、ポリリジンでコートした35mmディッシュにまき、DMEM(インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、セレン酸ナトリウム、及びプテスシンを添加)3mlを加えた。本発明の化合物(1)は、エタノールで $1 \times 10^{-8}M$ になるように溶解して加えた。細胞は、3日間培地交換なしで培養した。その後、細胞を、2%グルタルアルデヒドを含むPBSで固定し、位相差顕微鏡で観察した。結果を表1に示す。

【0083】

【表 1】

製造例番号	神経突起伸長効果
8	+++
9	++++
10	++++
12	++
13	+++
14	+++
15	+++
18	++
19	+++
20	++++
22	++
23	+++
24	++++
bFGF	++
陰性対照	0

0 : 効果なし、+ : わずかに効果あり、++ : やや効果あり、

+++ : 強い効果あり >160%、++++ : 極めて強い効果あり >200%

【0 0 8 4】

【発明の効果】

化合物（1）は、優れた神経突起伸展効果を有し、また、SOD 遺伝子変異による障害を抑制する作用を有するので、神経変性疾患、とりわけ、筋萎縮性側索硬化症の予防又は治療薬として有用であり、また、SOD 変異遺伝子変異による障害を抑制する薬として有用である。

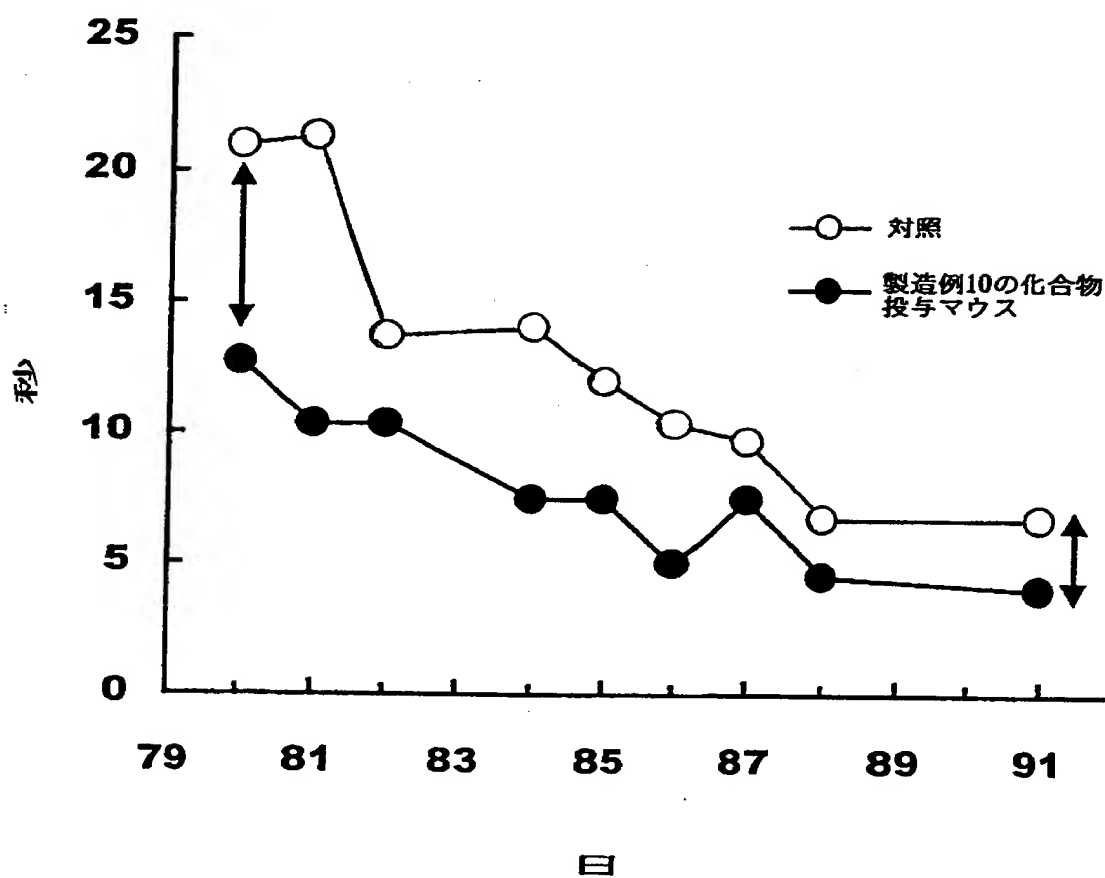
【図面の簡単な説明】

【図 1】

変異SOD-1 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスにおけるバーテスト（運動機能確認）の結果を示す図である。

【書類名】 図面

【図1】

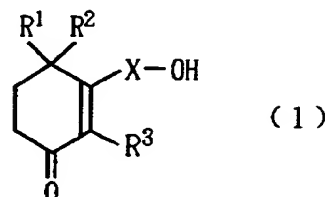


【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 式(1)

【化1】



〔式中、R¹、R² 及び R³ はそれぞれ H 又は CH₃ を示し、X は C 数 10～28 のアルキレン基又はアルケニレン基を示す〕

で表されるシクロヘキセノン長鎖アルコール化合物を有効成分とする、神経変性疾患の予防又は治療薬。

【効果】 化合物(1)は、優れた神経突起伸展効果を有し、また、SOD 遺伝子変異による障害を抑制する作用を有するので、神経変性疾患、とりわけ、筋萎縮性側索硬化症の予防又は治療薬として有用であり、また、SOD 変異遺伝子変異による障害を抑制する薬として有用である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006138]

1. 変更年月日	1990年 8月14日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区京橋2丁目3番6号
氏 名	明治乳業株式会社